

PCT/JP98/00483

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

25.02.98

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application:

1 9 9 7 年 2 月 5 日

REC'D 17 APR 1998

WIPO

PCT

出 願 番 号
Application Number:

平成 9 年特許願第 0 2 2 5 9 4 号

出 願 人
Applicant (s):

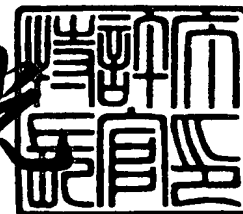
サントリー株式会社

PRIORITY DOCUMENT

1 9 9 8 年 4 月 3 日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Patent Office

荒井 寿光



出証番号 出証特平 10-3024704

【書類名】 特許願

【整理番号】 973054

【提出日】 平成 9年 2月 5日

【あて先】 特許庁長官 荒井 寿光 殿

【国際特許分類】 A61K 37/02

【発明の名称】 心肥大治療用医薬組成物

【請求項の数】 4

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号 サントリー株式会社 生物医学研究所内

【氏名】 猪俣 則夫

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号 サントリー株式会社 生物医学研究所内

【氏名】 山木 明

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号 サントリー株式会社 生物医学研究所内

【氏名】 古谷 真優美

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号 サントリー株式会社 生物医学研究所内

【氏名】 日高 寿範

【特許出願人】

【識別番号】 000001904

【氏名又は名称】 サントリー株式会社

【代表者】 鳥井 信一郎

【代理人】

【識別番号】 100077517

【弁理士】

【氏名又は名称】 石田 敬

【電話番号】 03-5470-1900

【選任した代理人】

【識別番号】 100087871

【弁理士】

【氏名又は名称】 福本 積

【選任した代理人】

【識別番号】 100088269

【弁理士】

【氏名又は名称】 戸田 利雄

【選任した代理人】

【識別番号】 100082898

【弁理士】

【氏名又は名称】 西山 雅也

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 036135

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9300154

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 心肥大治療用医薬組成物

【特許請求の範囲】

【請求項1】 受容体であるグアニリル・サイクラーゼ-A (GC-A) に結合し、cGMP産生を亢進しうるペプチドを有効成分とする心肥大治療用医薬組成物。

【請求項2】 前記ペプチド有効成分がナトリウム利尿ペプチド (NP) である請求項1に記載の医薬組成物。

【請求項3】 前記ナトリウム利尿ペプチド (NA) が心房性ナトリウム利用ペプチド (ANP) である、請求項2に記載の医薬組成物。

【請求項4】 前記ナトリウム利尿ペプチドが脳性ナトリウム利尿ペプチド (BNP) である、請求項2に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、受容体であるグアニリル・サイクラーゼ-A (Guanylyl cyclase-A GC-A) に結合し、cGMP産生を亢進しうるペプチド有効成分とする心肥大治療用医薬組成物に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

高血圧症や心弁膜症による左心室への負荷の増大、あるいは心筋梗塞、心筋炎や心筋症などによる心筋細胞自体の障害が生じると、主に心筋細胞の肥大により心室は心拍出量を保つようにその形態を変化させ、心重量が増加し、心肥大となる。

【0003】

このような心肥大は、ある程度までは心筋細胞障害や機械的負荷に対する適応現象と考えられるが、過剰な負荷が持続的に加わり肥大が著しいときには、収縮機能や拡張機能が破綻し、心不全に至るとともに不整脈も発生しやすくなる。また、心筋梗塞後の心不全においては、心肥大の程度はその後の予後を規定する要

因の一つであることが示されている。従って、過度の心肥大の形成を抑制する、あるいは心肥大を退縮させる薬剤は心不全の発症進展の防御に有効であると考えられる。

【0004】

心不全に対する治療法としては、従来心臓の収縮力を改善し、心拍出量を増大する目的で強心薬が主に用いられてきた。しかしながら、強心薬は心不全治療の最終目標である生命予後の改善、すなわち延命効果の面では効果がなく、むしろ予後を悪くするという結果が得られている (Packer, M., et al., N. Engl. J. Med., 325, 1468, 1991)。

【0005】

一方、心肥大の発生・進展には、カテコールアミン、アンジオテンシンII、アルドステロン、エンドセリン、バソプレッシンなどの神経体液性因子が関与することが示唆されており、これらの因子の産生あるいは情報伝達系を阻害する薬剤の開発、臨床応用が進められている。しかし、生体内において心肥大の発生機序にはこれら因子の複数が関わっており、単一の因子に対する拮抗作用だけでは不十分であることが予想される。

【0006】

例えば、アンジオテンシンIIを産生する酵素であるアンジオテンシン変換酵素 (ACE) の阻害剤は、動物モデルにおいて心肥大の発症進展を抑制し (Brilla, C. G., et al., Circulation, 83, 1771, 1991)、臨床的にも慢性心不全患者に投与した場合、心肥大を退縮させ、生命予後を延長することが観察されているが (The SAVE investigators, N. Engl. J. Med., 327, 678, 1992)、その効果は未だ十分なものとは言えない。

【0007】

実際に、最先端の治療を行っても心不全の発症後5年間の死亡率は現在なお約50%に達している。最近エンドセリン拮抗薬 (Ito, H., et al., Circulation, 89, 2198, 1994) やバソプレッシン拮抗薬 (Tomura, Y., et al., Circulation, 94 (Sup

ple. I), I-264, 1996) が動物モデルにおいて心肥大の形成を抑制することが報告されているが、さらに新しいメカニズムに基づく心肥大治療薬の開発が望まれている。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】

従って、本発明の目的は心肥大の発症進展の防止に有効な医薬組成物を提供することであり、更に詳しくは、受容体であるGC-Aに結合し、cGMP産生を亢進しうるペプチド有効成分とする心肥大治療用医薬組成物を提供することである。

【0009】

【課題を解決するための手段】

本発明において有効成分として用い得るペプチドは、受容体であるGC-Aに結合し、cGMP産生を亢進しうる特性を有するペプチドであればよい。具体的にはナトリウム利尿ペプチド(NP)、例えば心房性ナトリウム利尿ペプチド(以下、ANP)、脳性ナトリウム利尿ペプチド(BNP)等が挙げられる。

【0010】

ANPとしては、主に28個のアミノ酸残基よりなるヒト由来 α -hANP(B.B.R.C., Vol.118, p131-139, 1984)(配列番号: 1)やラット由来 α -rANP(B.B.R.C., Vol.121, p585-592, 1984)(配列番号: 2)を用いることができるが、更に、本発明に係る有効成分としてのペプチドとしては、ANPのリング構造(Cysに基づくジスルフィド結合の形成)及びリング構造に続くC末端部を有するペプチドであればよく、このペプチドには α -hANPの7-28位のアミノ酸残基を有するペプチド(配列番号: 3)やBNP(B.B.R.C., Vol.159, p1427-1434, 1989)(配列番号: 4)等、が挙げられる。

【0011】

即ち、 α -hANPに係るアミノ酸配列に基づき、当業者であれば適宜公知の方法により、当該配列中のアミノ酸残基を欠失、置換、付加、挿入等の修飾を施すことが可能であり、得られたペプチドがANPの受容体であるGC-Aに結合し、cGMP産生を亢進しうるペプチドであればいずれも用いることができる。

また、当該ペプチドは天然から純粋に単離・精製されたもの、化学合成法または遺伝子組換え法により製造されたものの何れをも用いることができる。これらのペプチドとしては、前記のもの他に、カエルANP（配列番号：5）、ブタBNP（Nature, Vol. 332, p78-81, 1988）（配列番号：6）、ラットBNP（B.B.R. C., Vol. 159, p1420-1426, 1989）（配列番号：7）、ニワトリNP（配列番号：8）などが挙げられる。

【0012】

更に、本発明に係るペプチドは、無機塩、例えば塩酸、硫酸、リン酸あるいは有機酸、例えば蟻酸、酢酸、コハク酸、クエン酸等の酸付加塩として用いることができる。また、本発明に係る医薬組成物は、本発明に係るペプチドの遊離形としても、あるいはその医薬的に許容し得る塩であってもよい。

本発明に係るペプチド又はその薬理学的に許容し得る塩は、自体公知の薬理学的に許容しうる担体、賦形剤、希釈剤などと混合してペプチド医薬に一般に使用されている投与方法、すなわち非経口投与方法、例えば静脈内投与、筋肉内投与、皮下投与などによって投与するのが好ましい。

【0013】

経口投与した場合、本発明の医薬組成物は消化管内で分解を受けるため、この投与方法は一般的には効果的でないが、消化管内で分解を受けにくい製剤、例えば活性成分である本ペプチドをリボゾーム中に包容したマイクロカプセル剤として経口投与することも可能である。また、直腸、鼻内、舌下などの消化管以外の粘膜から吸収せしめる投与方法も可能である。この場合は坐剤、点鼻スプレー、舌下錠といった形態で投与することができる。

本発明に係る医薬組成物の投与量は、疾患の種類、患者の年齢、体重、症状の程度及び投与経路などによっても異なるが、一般的に毎時 $0.5 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 0.5 \text{mg}/\text{kg}$ の範囲で投与することができ、 $2.0 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 0.1 \text{mg}/\text{kg}$ の範囲で投与するのが好ましい。

【0014】

【発明の実施の形態】

ANPは心臓より分泌され、水電解質代謝および血圧の調節に重要な役割を果

たすペプチドホルモンである。ANPの受容体は膜結合型グアニル酸シクラーゼ構造をとり、GC-AあるいはNPR-Aと称されている。即ち、ANPはGC-Aに結合し、細胞内のサイクリックグアノシンモノフォスフェート（cGMP）を上昇させることにより利尿・血管拡張作用などの生理作用を発現する。

【0015】

ヒトおよびモデル動物において、心肥大および心不全の重症度に伴い、血中ANP濃度が上昇することが知られている。また、ANPは正常心臓では主として心房で合成されるが、心肥大時には心室でのANP産生も著明に増加する。このように病態の進展に伴い産生亢進されるANPは心不全に対する代償機構として生体防御的に作用していると考えられている。実際にANPは心不全患者において血管拡張作用および利尿作用を発現し、心臓の前負荷、後負荷を軽減し、血行動態を改善する効果が認められている。

【0016】

しかし、心肥大に対してANPがいかなる作用を有するかについては明らかにされていない。一方、CaoおよびGardnerはANPが*in vitro*において培養心線維芽細胞のDNA合成を阻害することを報告している（Cao, L. and Gardner, G., *Hypertension*, 25, 227, 1995）が、心室において最も大きな容量（約70%）を占め、心肥大の中心的役割を果たす心筋細胞の肥大に対するANPの作用は未だ検討されていない。

【0017】

更に、生体内でANPの代謝分解に関与する中性エンドペプチダーゼ（NEP, EC 3.4.24.11）の阻害剤が容量負荷により誘発した心肥大モデルラットにおいて、利尿作用および軽度の心肥大抑制作用を示すことが報告されているが、この時血中ANPの上昇は明確でなく、また、NEPはANPのみならずブラジキニンなど他のペプチドホルモンの代謝にも関わることから、利尿作用や心肥大抑制作用がANPの分解を抑制したことに基づく、即ち、ANPの作用を反映したものかどうかは明らかでない（Willenbrock, R. et al., *Hypertension*, 27, 1259, 1996）。

【0018】

このように、現在ANPそのものの投与により心肥大の発症が抑制される、あるいは心肥大が退縮されるか否かは判っていない。従って、本発明者らは圧負荷による心肥大モデルラットを用いてANPの心肥大発生予防効果および退縮効果を検討した。

【0019】

1. 圧負荷によるラット心肥大モデルの作製方法

実験にはSprague-Dawley系の9週齢雄性ラットを用いた。ペントバルビタールナトリウム(40mg/kg)の腹腔内投与によりラットを麻酔し、腹臥位に固定した。開腹後、腹部大動脈を露出させ、左右の腎動脈間の部分を剥離した。21G注射針を大動脈に沿わせ、左右の腎動脈間で大動脈とともに絹糸で結紮し、その後注射針を引き抜くことにより、大動脈狭窄を行った。本モデルにおいてはこのような腹部大動脈狭窄により収縮期血圧が上昇し、心臓の後負荷が増大して、左心室の肥大が生じる。偽手術[Sham-operation (Sham)]群には腹部大動脈の剥離のみを施した。

【0020】

2. ANPの投与方法

ペントバルビタールナトリウム(40mg/kg)の腹腔内投与による麻酔下で、ラット頸部を切開し、右頸静脈にシリコンカテーテルを挿入し、背部で固定後、カテーテルを微量注入ポンプに接続した。ANPは5%グルコースに溶解し、 $0.1 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{分}$ の速度で静脈内に持続投与した。対照群およびSham群には5%グルコースを $2.5 \mu\text{l}/\text{分}$ の速度で持続静脈内投与した。

【0021】

3. 評価方法

試験終了時に、ペントバルビタールナトリウム(40mg/kg)の腹腔内投与によりラットを麻酔し、左頸動脈にポリエチレンカテーテルを挿入し、圧トランスデューサーを介して血圧および心拍数を測定した。その後、血漿中 $\alpha\text{-hANP}$ およびrat ANP濃度を直接的に、およびANPの細胞内情報伝達のセカンドメッセンジャーであるcGMP濃度を間接的に測定するために、1%(w

配列

Met Met Arg Asp Ser Gly Cys Phe Gly Arg Arg Ile Asp Arg Ile Gly

1

5

10

15

Ser Leu Ser Gly Met Gly Cys Asn Gly Ser Arg Lys His

20

25

【図面の簡単な説明】

【図 1】

図 1 は大動脈狭窄によるラット心肥大モデルにおいて、狭窄直後より ANP または 5 % グルコースを 1 週間投与した場合の Sham 群、対照群および ANP 投与群の左心室重量 / 体重比 (A)、および右心室重量 / 体重比 (B) を示すグラフである。

【図 2】

図 2 は図 1 と同様の条件における、薬物投与期間中の実験動物の尿排泄量 (A)、および尿中ナトリウム排泄量 (B) の経時変化を示すグラフである。

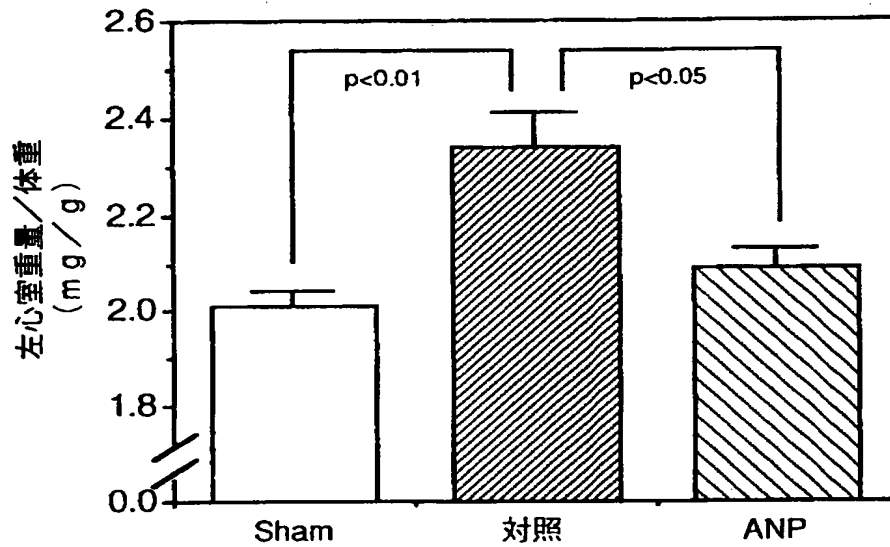
【図 3】

図 3 は大動脈狭窄によるラット心肥大モデルにおいて、狭窄 15 週間後より ANP または 5 % グルコースを 3 週間投与した場合の Sham 群、対照群および ANP 投与群の左心室重量 / 体重比 (A)、および右心室重量 / 体重比 (B) を示すグラフである。

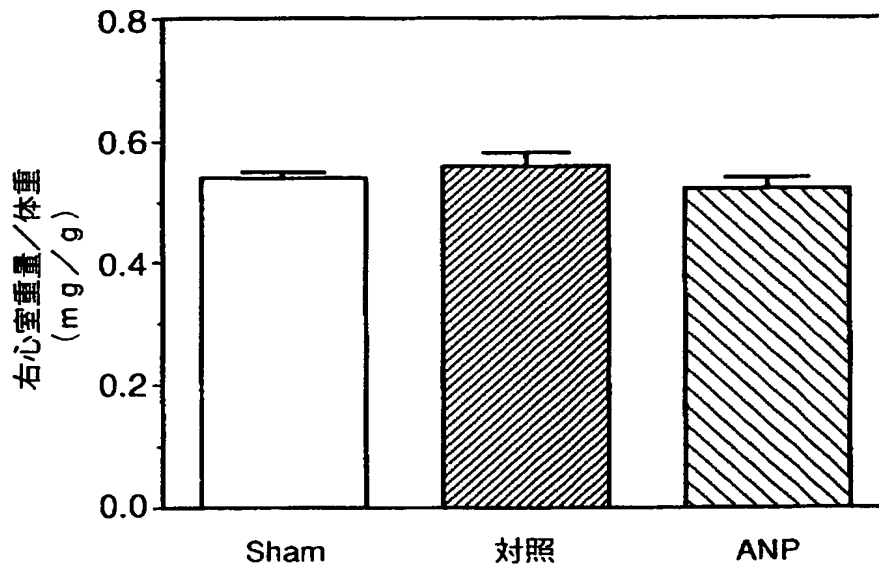
【書類名】 図面

【図1】

A. 左心室／体重比



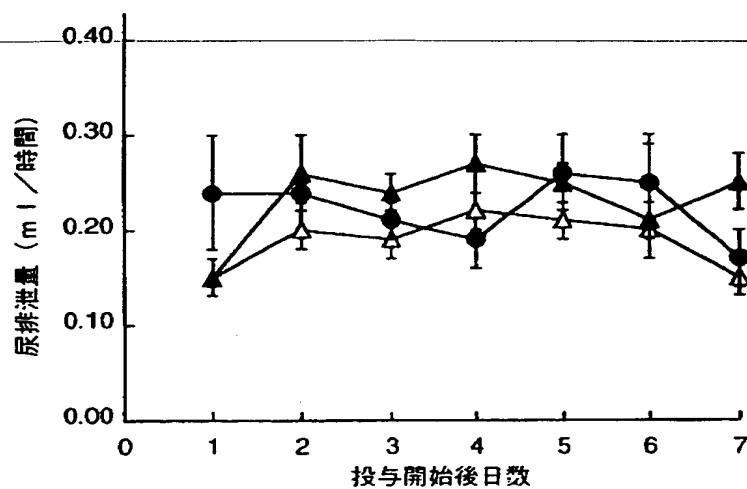
B. 右心室／体重比



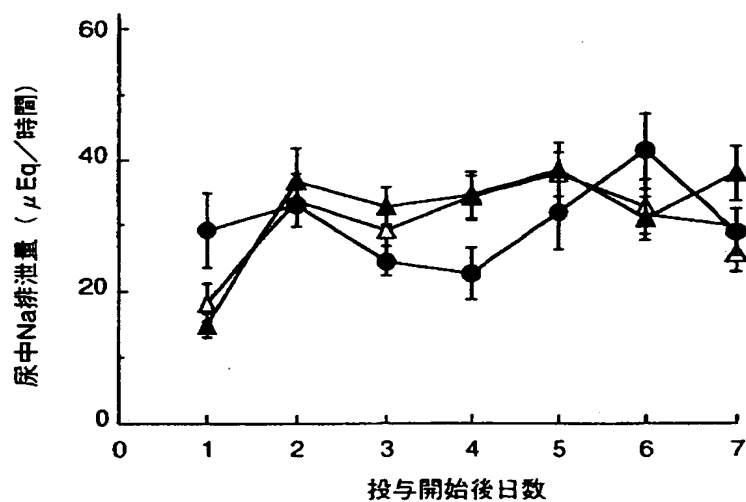
各値はSham群 19例、対照群 20例、ANP群 11例の平均値±標準誤差を表す

【図2】

A. 尿排泄量



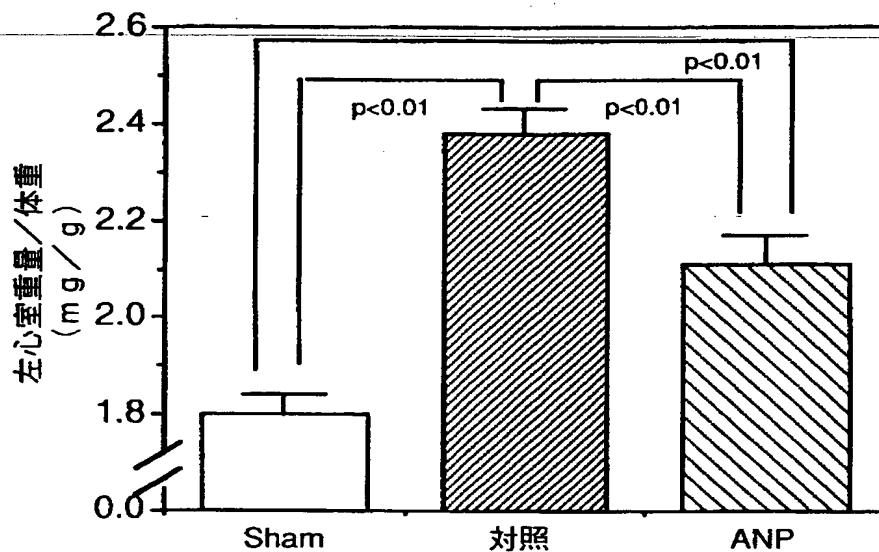
B. 尿中ナトリウム排泄量



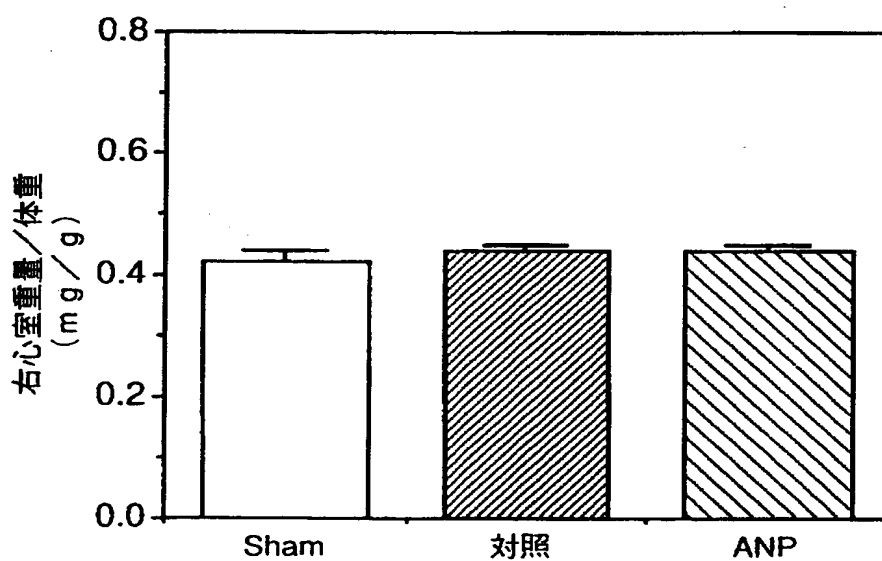
△；Sham群 (n=19), ▲；対照群 (n=20), ●；ANP 0.1 $\mu\text{g/kg/min}$ 投与群 (n=12)
各値は平均値±標準誤差を表わす。

【図3】

A. 左心室／体重比



B. 右心室／体重比



各値はSham群 9例、対照群 9例、ANP群 12例の平均値±標準誤差を表す

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 慢性心不全発症の原因である心肥大の治療用医薬組成物を提供することにある。

【解決手段】 受容体であるGC-Aに結合し、cGMP産生を亢進しうるペプチドを有効成分とする心肥大治療用医薬組成物。

【選択図】 なし

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 000001904
【住所又は居所】 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号
【氏名又は名称】 サントリー株式会社

【代理人】 申請人

【識別番号】 100077517
【住所又は居所】 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37森ビル 青和特許法律事務所
【氏名又は名称】 石田 敬

【選任した代理人】

【識別番号】 100087871
【住所又は居所】 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37森ビル 青和特許法律事務所
【氏名又は名称】 福本 積

【選任した代理人】

【識別番号】 100088269
【住所又は居所】 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37森ビル 青和特許法律事務所
【氏名又は名称】 戸田 利雄

【選任した代理人】

【識別番号】 100082898
【住所又は居所】 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37森ビル 青和特許法律事務所
【氏名又は名称】 西山 雅也

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000001904]

1. 変更年月日 1990年 8月13日
[変更理由] 新規登録
住 所 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号
氏 名 サントリー株式会社

000001904

THIS PAGE BLANK (USPTO)